



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS
SAMARA RAQUEL SOUZA RIBEIRO ANDRADE

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL NANOCARREADO

POMBAL-PB

2018

SAMARA RAQUEL SOUZA RIBEIRO ANDRADE

AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL NANOCARREADO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá

POMBAL

2018

A553a Andrade, Samara Raquel Souza Ribeiro.
Ação antimicrobiana de carvacrol nanocarreado / Samara Raquel Souza Ribeiro Andrade. - Pombal, 2018.
27 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá".

Referências.

1. Óleos Essenciais. 2. Nanotecnologia. 3. Sanitização. I. Natalino de Sá, João Paulo. II. Título.

CDU 633.8(043)

"AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL NONOCARBOADO"

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 22 / 05 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

João Paulo Natalino de Sá
Orientador

Patrício Borges Maracajá
Examinador Interno

George do Nascimento Ribeiro
Examinador Externo

POMBAL-PB
MARÇO - 2018

Dedico este trabalho a João Manoel de Andrade, meu esposo, a minha mãe Lindaura Souza Brotas e meu padrasto Sebastião de Sousa Silva, por estarem sempre ao meu lado. Aos meus amigos e professores Aline Medeiros e Patrício Maracajá por estarem ao meu lado durante toda jornada, pela amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me guiado pelos caminhos que me trouxeram até aqui e por ter me dado sabedoria para encarar os desafios.

Agradeço imensamente a meu esposo, minha mãe e meu padrasto que sempre me apoiaram nos momentos mais felizes e nos mais difíceis de minha vida, com todo amor e carinho, mesmo que a resolução dos problemas não estivesse ao seu alcance, mas sempre me apoiaram moralmente.

Agradeço aos meus amigos e professores Aline Carla de Medeiros e Patrício Borges Maracajá, por me incentivarem a prosseguir com os planos e sonhos, mesmo diante de uma jornada de trabalho extensa.

É momento de agradecer também à oportunidade de poder cursar um mestrado em uma Instituição pública, gratuita e com profissionais de qualidade, que fazem com que fortaleça nossa vontade de alçar vãos mais altos.

Não poderia deixar de expor minha gratidão a gestão e professores da Instituição de Ensino em que trabalho, a ECI Mestre Júlio Sarmiento, que possibilitou e incentivou o término desse curso com êxito.

RESUMO

Diferentes compostos naturais vêm sendo pesquisados nos últimos anos para serem utilizados como agentes bactericida ou bacteriostático sob bactérias patogênicas ou deterioradoras em alimentos. Dentre estes compostos se destaca o carvacrol. O carvacrol é um composto fenólico presente em muitos óleos essenciais como o de orégano, tomilho e manjerona. Dentre os diferentes micro-organismos vinculados a alimentos se destacam *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os tratamentos mais comuns para mastite bovina são dessa forma, antibióticos naturais, como o carvacrol, podem ser uma alternativa para o controle destes micro-organismos em alimentos. Inúmeros artigos são reportados na literatura sobre as possíveis inativações microbianas a partir de carvacrol, entretanto, sua baixa afinidade pela água, torna-se um entrave para a sua utilização em alimentos, pois grande parte destas matrizes são constituídas por água. Dessa forma, objetivando minimizar estes aspectos negativos, foram formulados nanocarreadores à base de Albumina Sérica Bovina (BSA) veiculando carvacrol em diferentes valores de pH (4,0,5,5 e 7,2) e avaliado sua ação antimicrobiana pela Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bactericida (CMB) e pelo teste de difusão em ágar. As formulações com o carvacrol nanocarreado apresentaram pela técnica de microdiluição, CMB iguais para os isolados (*S. aureus* e *E. coli*), de 0,50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ para BSA-E em pH 4,0 e 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ em pH 5,5 e 7,2. Para as formulações com carvacrol sem nanocarreador apresentaram CMB de 1,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ em pH 4,0 e 2,00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ em pH 5,5 e 7,2. A análise do espectro de ação antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar (halo de inibição) demonstrou que as formulações com nanocarreador foram igualmente efetivos para bactéria Gram positiva e Gram negativa ($p > 0,05$). Dessa forma foi possível constatar que o carvacrol nanocarreado teve ação antimicrobiana mais efetiva que o carvacrol sem estar nanocarreado, podendo ser uma alternativa viável como desinfetante para diferentes segmentos na agroindústria.

Palavras – chave: Óleos essenciais, Nanotecnologia, sanitização.

ABSTRACT

Different natural compounds have been researched in recent years to be used as bactericidal or bacteriostatic agents under pathogenic or deteriorating bacteria in food. Among these compounds stands out the carvacrol. Carvacrol is a phenolic compound present in many essential oils such as oregano, thyme and marjoram. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* stand out among the different food-related microorganisms. The most common treatments for bovine mastitis are in this way, natural antibiotics, such as carvacrol, may be an alternative for the control of these microorganisms in food. Numerous articles are reported in the literature on possible microbial inactivations from carvacrol; however, their low affinity for water becomes a barrier to their use in food, since most of these matrices are water. Thus, in order to minimize these negative aspects, Bovine Sodium Albumin (BSA) based nanocarriers were formulated to carry carvacrol at different pH values (4,0,5,5 and 7,2) and evaluated their antimicrobial action by the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CMB) and the agar diffusion test. The formulations with the nanocarried carvacrol presented the same microbial dilution technique for the isolates (*S. aureus* and *E. coli*) of 0.50 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ for BSA-E at pH 4.0 and 1.00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ at pH 5.5 and 7.2. For the formulations with carvacrol without nanocarrier they presented CMB of 1.00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ at pH 4.0 and 2.00 $\mu\text{L. mL}^{-1}$ at pH 5.5 and 7.2. Analysis of the antimicrobial action spectrum by the agar diffusion technique (inhibition halo) demonstrated that the nanocarrier formulations were equally effective for Gram positive and Gram negative bacteria ($p > 0.05$). Thus, it was possible to observe that the nanocarried carvacrol had an antimicrobial action more effective than carvacrol without being nanocarried, and could be a viable alternative as disinfectant for different segments in the agroindustry.

Key words: Essential oils, Nanotechnology, sanitation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.0 – Ação do carvacrol com e sem nanocarreador sob <i>E. Coli</i> | 19 |
| FIGURA 2.0 – Ação do carvacrol com e sem nanocarreador sob <i>S. Aureus</i> | 20 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1.0 – Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e concentração mínima bactericida (CMB) de carvacrol com e sem nanocarreador..... | 16 |
| TABELA 2.0 - Diâmetro médio (mm) do halo de inibição microbiana por ação de E e BSA-E em pH 4,0; 5,5 e 7,2; e em solução tampão citrato em pH 3,5 (ST 3,5) sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> | 18 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BSA – Albumina de Soro bovino;

CMI – Concentração Mínima Inibitória;

CMB – Concentração Mínima bactericida;

BHI – Meio de cultura para cultivo de estafilococos;

CLSI – Clinicaland Laboratory Standards Institute;

DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado;

SAS – Statistical Analysis System;

pH – Potencial hidrogeniônico;

ST – Solução tampão.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1.0 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2.0 OBJETIVOS | 12 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 12 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 12 |
| 3.0 MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES BACTERIANAS | 13 |
| 3.2 OBTENÇÃO DO CARVACROL COM NANOCARREADOR | 13 |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) | 13 |
| 3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE CARVACROL COM E SEM NANOCARREADOR. | 14 |
| 3.5.VERIFICAÇÃO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL COM E SEM NONOCARREADOR PELO TESTE DE DIFUSÃO | 14 |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 15 |
| 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 16 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) | 16 |
| 4.2. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL COM E SEM NONOCARREADOR PELO TESTE DE DIFUSÃO | 17 |
| 5.0 CONCLUSÃO | 23 |
| 6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |

1.0 INTRODUÇÃO

Na agroindústria, o segmento relacionado à conservação de alimentos de origem animal e vegetal, constitui um dos grandes desafios deste setor. Os alimentos por serem constituídos por diferentes elementos (água, proteína, carboidratos, vitaminas, dentre outros), são considerados, em grande parte, como substrato excelente para multiplicação de micro-organismos. Dentre os diferentes micro-organismos vinculados aos alimentos, as bactérias, normalmente, se reproduzem em maior velocidade em relação aos demais, sendo assim, predominantes em diferentes alimentos agroindustriais.

Dentre as bactérias, *Staphylococcus aureuse* e *Escherichia coli*, são reportadas na literatura como um dos micro-organismos mais associados à deterioração nos alimentos e problemas de saúde pública (intoxicação e infecção alimentar).

Atualmente, tem se tornado cada vez mais evidente que a descoberta de novos fármacos não é suficiente para assegurar o sucesso do tratamento de muitas doenças. Problemas relacionados à baixa solubilidade e permeabilidade, rápido metabolismo e eliminação, distribuição inadequada e toxicidade de muitas substâncias candidatas a fármacos têm levado ao desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de contornar tais limitações. Dentre eles destacam-se os sistemas de liberação nanoestruturados (MÄDER e MEHNERT, 2001).

A nanotecnologia associada a diferentes agentes terapêuticos pode ser uma alternativa promissora para melhorar a efetividade de diferentes princípios ativos, como por exemplo, o desenvolvimento de nanocarreadores veiculando compostos naturais com ação antimicrobiana, visando melhorar a eficácia destas substâncias, dentre elas, os óleos essenciais.

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, sintetizados principalmente a partir do metabolismo secundário de plantas aromáticas, sendo amplamente utilizados em alimentos, como agentes aromatizantes, perfumes e fármacos. Dentre os diferentes óleos essenciais, destaca-se o carvacrol que apresenta ação anti-inflamatória, anestésica, antimicrobiana, antioxidante, dentre outros. Porém por sua baixa afinidade com a água, acaba tendo limitação de sua ação antimicrobiana em alimentos.

Quimicamente falando, óleo essencial é um óleo natural, com odor distinto, segregado pelas glândulas de plantas aromáticas, obtido por processo físico e estrutura química formada por carbono, hidrogênio e oxigênio, dando origem a complexa mistura de substâncias, que podem chegar a várias centenas delas, havendo predominância de uma a três substâncias que caracterizam a espécie vegetal em questão. (TRANCOSO, 2013)

Neste contexto, o desenvolvimento de um nanocarreador a partir da BSA com carvacrol pode ser uma alternativa viável para minimizar esta limitação, sendo uma alternativa viável para sua utilização como sanitizante em diferentes segmentos da agroindústria.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção e avaliação da ação antimicrobiana do carvacrol com e sem nanocarreador sob bactéria Gram positiva e Gram Negativa isoladas de leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o nanocarreador com carvacrol em diferentes condições de pH (4,0, 5,5 e 7,2);
- Avaliar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) de carvacrol com e sem nanocarreador sob bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*) isolados de leite.
- Determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB) do carvacrol com e sem nanocarreador sob bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e Gram negativa (*Escherichia coli*) isolados de leite.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada na cidade de Pombal, localizada no sertão da Paraíba, nos laboratórios do Departamento de Fitopatologia do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal em parceria com o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba, IFPB – Campus Sousa.

3.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES BACTERIANAS

Os isolados bacterianos utilizados foram uma Gram positiva representada por *Staphylococcus aureus* e uma Gram negativa representada por *Escherichia coli*, isoladas de leite, cedidas pelo Instituto Federal da Paraíba, Campus Sousa.

A partir das culturas puras de *S. aureus* e *E. coli* mantidas foram preparadas suspensões contendo cerca de 10^8 UFC·mL⁻¹. As células foram ativadas a partir de três repicagens consecutivas em caldo BHI, com posterior incubação a 37 °C por 24 h.

3.2 OBTENÇÃO DO CARVACROL COM NANOCARREADOR

Para a preparação do carvacrol sendo nanocarreador, foi utilizado a albumina de soro bovino (BSA) e carvacrol (99,0%), ambos comercialmente (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A BSA na concentração de $1,50 \times 10^{-2}$ mol·L⁻¹ foi pesada e dissolvida, separadamente, em solução tampão de citrato de sódio e ácido cítrico em pH 4,0 e 5,5. Para o pH 7,2, a BSA foi dissolvida em solução tampão de fosfato de sódio monobásico e dibásico.

Após a BSA estar totalmente dissolvida foi adicionada em cada uma das soluções contendo diferentes valores de pH (4,0, 5,5 e 7,2), o carvacrol em diferentes concentrações. Em seguida, cada solução obtida foi agitada em vortex por 30 min.

3.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

A CMI foi determinada pelo método da macrodiluição de acordo com a norma *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2003.

A densidade óptica de *S. aureus* e *E. coli*, obtidos a partir do item 3.1, foi ajustada em solução salina a 0,85% para a faixa de 0,089 a 0,120 a 625 nm utilizando espectrofotômetro, o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹.

Em seguida foram feitas diluições seriadas de carvacrol sem nanocarreador e carvacrol com nanocarreador em concentrações que variaram de $40 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,200 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, em tubos de ensaio contendo caldo Müller-Hinton. Posteriormente foi adicionada, cada bactéria em tubos separados, de forma a se obter uma concentração inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^5 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os tubos de ensaio foram então incubados a 37°C por 24 h. Este procedimento foi realizado para cada valor de pH (4,0; 5,5 e 7,2).

A CMI foi determinada como a menor concentração que não houve turvação do meio após 24 h de incubação.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE CARVACROL COM E SEM NANOCARREDOR.

Após a incubação de cada de bactéria para os diferentes tratamentos foi determinado se o carvacrol com ou sem nanocarreador possui atividade bacteriostática ou bactericida. Para isso, os tubos de ensaio, que após a incubação não apresentam turbidez foram analisados. Os tubos foram agitados em vortex por 1 min. Em seguida, 0,1 mL de cada tubo foi, assepticamente, adicionados em placas de Petri contendo ágar padrão para contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. A CMB foi considerada como a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano nas placas.

3.5 VERIFICAÇÃO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL COM E SEM NANOCARREDOR PELO TESTE DE DIFUSÃO

A verificação da ação antimicrobiana foi realizada pela técnica da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, de acordo com a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003), com modificações. O ágar Müller-Hinton (HiMedia) foi preparado e esterilizado conforme as instruções do fabricante.

A absorbância de cada bactéria foi ajustada, separadamente, para 0,100 a 625 nm em espectrofotômetro, o que corresponde ao padrão McFarland 0,5, que contém, aproximadamente, $1,0 \times 10^8 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta suspensão foi utilizada para inocular as placas. Um swab de algodão esterilizado foi mergulhado na suspensão preparada e espalhado sob toda a superfície da placa de Petri assepticamente.

Em seguida, foi perfurados poços no ágar com moldes de plástico, previamente cortados e autoclavados ($121^\circ\text{C}/15 \text{ min.}$) de forma a padronizar o diâmetro da perfuração em 5 mm. Foram inoculados $20 \mu\text{L}$ de cada formulação, em cada poço. Em seguida as placas

forma incubadas a 35 °C por 24 h. Após este período os halos foram medidos com a placa de Petri invertida, utilizando-se uma régua milimetrada. Todo o experimento foi realizado em duplicata e com três repetições.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado para o experimento um delineamento inteiramente casualizado (DIC) num fatorial composto, para as análises microbiológicas. Para a análise do teste de difusão em ágar, foi realizado um fatorial de 2 x 7, sendo os dados obtidos analisados por Análise de Variância (teste F) a 5% de probabilidade e uma vez constatados o efeito significativo do tratamento, aplicou-se então o teste Tukey, a 5% de probabilidade. Todo experimento microbiológico foi realizado com três repetições, sendo os dados analisados no programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Versão 9.2.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (CMI) E MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

A atividade antibacteriana de óleos essenciais como o carvacrol pode ser classificada entre forte, moderada e fraca, que corresponde a CMI de até 500; entre 600 e 1.500; e acima de 1.600 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALIGIANNIS et al., 2001).

Todos as formulações com o carvacrol nanocarreado apresentaram forte ação inibitória (CMI < 500 $\mu\text{g/mL}$), tanto para bactéria Gram positiva (*S. aureus*) como para bactéria Gram negativa (*E. coli*). Entretanto, foi possível constatar que maiores concentrações de carvacrol foram necessários para a inativação de ambas as bactérias, quando o carvacrol não estava nonacarreado (Tabela 1).

Tabela 1–Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) de carvacrol com e sem nanocarreador

| Bactéria | <i>S. aureus</i> | | <i>E. coli</i> | | |
|----------|------------------|------|----------------|------|------|
| | Tratamento | CMI* | CMB* | CMI* | CMB* |
| | CN 4,0 | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| | CN 5,0 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| | CN 7,0 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| | C 4,0 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| | C 5,5 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| | C 7,2 | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |

* = $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, CN 4,0; 5,5 e 7,2: carvacrol com nanocarreador; C- 3,5; 5,0 e 7,0: carvacrol sem nanocarreador

É possível observar a partir da Tabela 1, a CMI não diferiu da CMB para o mesmo valor de pH para carvacrol com ou sem nanocarreador. Entretanto, todos os tratamentos com o carvacrol com nanocarreador, foram mais eficazes em uma concentração menor. Tal efeito pode ter sido favorecido pela maior difusão do carvacrol quando nonocarreado, que permite uma maior interação em meio aquoso, ao mesmo tempo em que protege o princípio ativo contra reações indesejáveis do meio externo, tais como a volatilização.

Observa-se que em pH de 4,2 o carvacrol teve uma ação mais eficaz em relação aos demais pH. Tal efeito pode estar relacionado ao fato de que menor valor de pH predispõe maior estresse a células vegetativas, que ficam mais sensíveis a ação do carvacrol, favorecendo ao sinergismo na ação antimicrobiano do carvacrol.

Donsì et al., (2012) investigaram o efeito de diferentes formulações de nanoemulsão contendo diferentes componentes de óleos essenciais: carvacrol, limoneno e cinamaldeído, em

relação a atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os óleos essenciais que estavam nanoencapsulados demonstraram melhor ação antimicrobiana (DONSI et al., 2012).

Chen et al., (2009) ao avaliar a CMI e CMB de eugenol em caldo soja Trypticaseína-TSB sobre *S. aureus* e *E. coli*, também obtiveram os mesmo valores para CMI e CMB para ambos os isolados ($0,9 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em outro trabalho, a adição do carvacrol e timol em molho de soja mostraram-se eficaz contra *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *L. monocytogenes* sem causar impacto sensorial (MOON;RHEE, 2016). Tais resultados respaldam a ação antimicrobiana de amplo espectro do eugenol, como evidenciado neste estudo.

Diferentes estudos demonstram que o uso de óleos essenciais nanocarreados em sistemas de distribuição, tais como, nanoemulsões, lipossomas, micelas poliméricas, dentre outros, tendem a melhorar a atividade de óleo essencial ou seus componentes, principalmente pela melhor distribuição e solubilidade do princípio ativo hidrofóbico em meio aquoso (DONSI et al., 2012; DONSI, et al., 2014; GHOSH, et al., 2014; MCCLEMENTS; RAO, 2011; SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013; WEISS et al., 2009).

4.2. AÇÃO ANTIMICROBIANA DE CARVACROL COM E SEM NONOCARREADOR PELO TESTE DE DIFUSÃO

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e, ou, seus componentes, como o carvacrol, pode ser classificada em três níveis: ausente (zona de inibição $\leq 12 \text{ mm}$), atividade moderada ($12 \text{ mm} < \text{zona de inibição} < 20 \text{ mm}$) e uma forte atividade (inibição $\geq 20 \text{ mm}$) (ROTA; HERRERA; MARTI, 2008).

Na Tabela 2 e nas Figuras 1 e 2 estão demonstradas a ação do carvacrol com e sem nanocarreador pelo teste de difusão em ágar sobre *S. aureus* e *E. coli*.

Constatou-se que a formulação do carvacrol com nanocarreador apresentou atividade antimicrobiana forte enquanto o carvacrol sem nanocarreador apresentou atividade antimicrobiana moderada, independente do pH e da bactéria testada. A solução tampão citrato em pH 4,0 (ST) apresentou atividade antimicrobiana ausente (Tabela 2).

Tabela 2 - Diâmetro médio (mm) do halo de inibição microbiana por ação de E e BSA-E em pH 4,0; 5,5 e 7,2; e em solução tampão citrato em pH 3,5 (ST 3,5) sobre *E. coli* e *S. aureus*

| Formulação | Diâmetro do halo de inibição (mm) | | | |
|------------|-----------------------------------|----|------------------|-----|
| | Média* ± desvio padrão | | | |
| | <i>E. coli</i> | | <i>S. aureus</i> | |
| C- 4,0 | 13,23± 0,1 | Aa | 14,31± 0,13 | Aa |
| C- 5,5 | 12,26 ± 0,08 | Aa | 13,20± 0,17 | Aa |
| C- 7,2 | 12,22 ± 0,06 | Aa | 13,13 ± 0,09 | Aa |
| CN 4,0 | 22,57 ± 0,25 | Bb | 25,0 ± 0,19 | Ba |
| CN 5,5 | 21,75 ± 0,18 | Bb | 24,80± 0,22 | BCa |
| CN 7,2 | 20,86 ± 0,11 | Bb | 24,30± 0,13 | Ca |
| ST 4,0 | 7,31 ± 0,17 | Cb | 7,46 ± 0,11 | Da |

* Média de três repetições. Valores na mesma coluna, seguidos por mesma letra maiúscula, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Valores na mesma linha, seguidos por mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

A formulação do carvacrol com nanocarreador sobre *E. coli* não demonstrou ser influenciado pelo pH do meio ($p > 0,05$). Em contrapartida, foi mais efetiva sobre *S. aureus* ($p < 0,05$), embora em ambos os isolados, o carvacrol nonacarreado (CN) demonstrou forte atividade inibitória (zona de inibição > 20 mm) em comparação a todos as demais formulações ($p < 0,05$). O uso de ST 3,5 não apresentou atividade inibitória pelo teste de difusão (zona de inibição < 12 mm), respaldando a ausência de atividade bactericida encontrado pelo teste de CMI e CMB.

Figura 1–Ação do carvacrol com e sem nanocarreador sob *E. coli* .

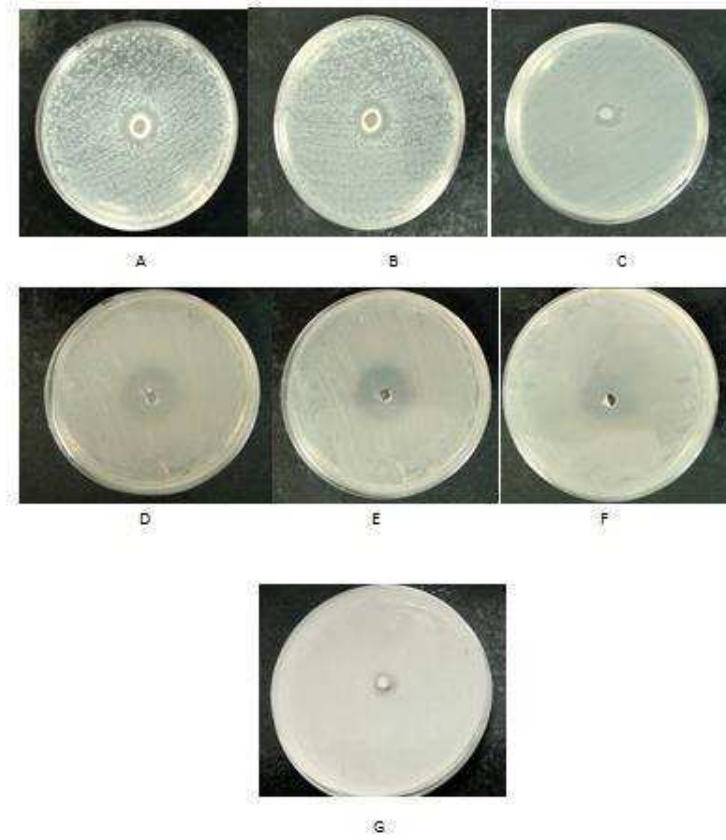


Figura 1 - Teste de difusão sob *E. coli* para os diferentes tratamentos: A = carvacrol sem nanocarreador em pH 4,0; B = carvacrol sem nanocarreador em pH 5,5; C = carvacrol sem nanocarreador em pH 7,2; D=carvacrol com nanocarreador em pH 4,0; E = carvacrol com nanocarreador em pH 5,5; F = carvacrol com nanocarreador em pH 7,2 e G = Solução tampão citrato em pH 4,0.

FIGURA 2.0 – AÇÃO DO CARVACROL COM E SEM NANOCARREADOR SOB *S. AUREUS*

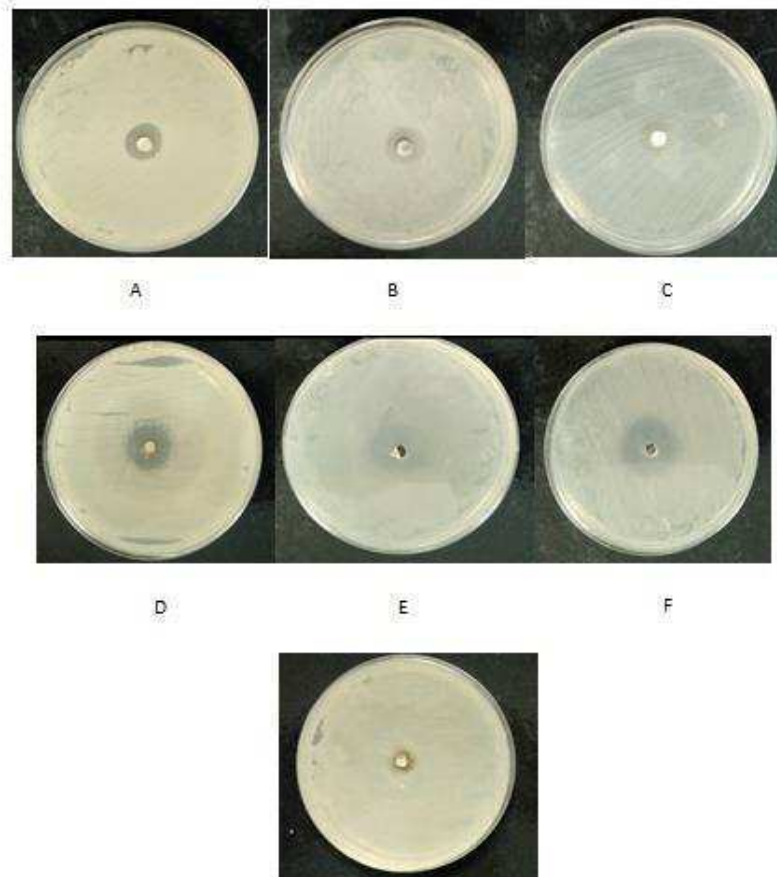


Figura 2 - Teste de difusão sob *S. aureus* para os diferentes tratamentos: A = carvacrol sem nanocarreador em pH 4,0; B = carvacrol sem nanocarreador em pH 5,5; C = carvacrol sem nanocarreador em pH 7,2; D=carvacrol com nanocarreador em pH 4,0; E = carvacrol com nanocarreador em pH 5,5; F = carvacrol com nanocarreador em pH 7,2 e G = Solução tampão citrato em pH 4,0.

Diferentes estudos sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e seus principais componentes, como eugenol, timol, carvacrol, dentre outros, são reportados na literatura por testes de difusão em ágar e ou microdiluição (DAVIDSON et al., 2005; DONSI et al., 2012; KLAN; JER; SMOLE, 2010; NUTCHA et al., 2012).

Entretanto, é difícil comparar os resultados desses estudos, devido, entre outros fatores, a elevada volatilidade e baixa solubilidade destes compostos na fase aquosa, que tendem a difundir de forma diferente em testes como o de difusão em ágar (NUTCHA et al., 2012).

Além destes fatores, o tamanho do halo de inibição pode ser influenciado pela capacidade de difusão de cada antimicrobiano. O método padronizado pela CLSI foi desenvolvido para análise de agentes antimicrobianos convencionais, como os antibióticos

sintéticos. Essas substâncias, em geral, apresentam maior caráter hidrofílico e difundem-se mais facilmente em ágar. Entretanto, substâncias voláteis, viscosas e com pouca solubilidade em água, como o eugenol, podem ter sua difusão comprometida (MONTANARI et al., 2012).

Diferente do resultado reportado em nosso estudo pelo teste de CMI e CMB, no teste de inibição por difusão em ágar a formulação BSA-E em pH 3,5 apresentou maior atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* em comparação a *E. coli* ($p < 0,05$), porém, ambos demonstraram forte atividade antimicrobiana.

Diferenças na susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, de componentes majoritários em óleos essenciais como o eugenol, têm sido relatados entre bactérias gram-positivas e gram-negativas (CONDO; SALA, 1997; DAVIDSON et al., 2006; SHAH; DAVIDSON; ZHONG, 2013).

A diferença de ação da formulação do carvacrol nanocarreador entre *E. coli* e *S. aureus*, pelo teste do halo de inibição no presente trabalho, pode ser atribuído ao fato das bactérias gram-positivas apresentarem uma parede celular mais espessa de peptidoglicano, enquanto as bactérias gram-negativas, apesar de apresentarem uma camada menos espessa de peptidoglicano, apresentam uma membrana externa de lipo-polissacarídeos, apresentando, geralmente, menor sensibilidade aos antimicrobianos. No entanto, a membrana externa não é completamente hidrofóbica, e alguns compostos podem difundir-se através da membrana pela presença de porinas (DAVIDSON et al., 2005; PISIAT; NIKAIDO, 1992); e dessa maneira apresentar ação antimicrobiana em bactérias gram-negativas, embora menos efetiva.

Silvestri et al. (2010) relatam que existem fatores que podem interferir nos resultados obtidos pela técnica de microdiluição e pelo método de difusão em ágar: condições de cultivo (tempo de incubação, temperatura, taxa de oxigênio), meio de cultura, concentração das substâncias testadas, dispersão e emulsificação dos agentes utilizados na emulsão óleo-água. Tais fatores tendem a desfavorecer a uma boa correlação entre estes métodos.

Outro problema observado ao se utilizar a técnica de difusão em ágar, em compostos ativos hidrofóbicos, como o eugenol, é a difusão irregular dessas substâncias, resultado em concentrações desiguais do óleo (princípio ativo) no ágar, podendo ocasionar a formação de regiões com atividade antimicrobiana variável, dificultando sua reprodutibilidade e a comparação de dados (SETZER et al., 2004; SOKMEN et al., 2004).

Diante dos resultados apresentados pelo teste da inibição da multiplicação microbiana por difusão em ágar, embora uma correlação direta com a técnica de microdiluição não seja completamente possível em nosso estudo, é possível afirmar que o tratamento com o

carvacrol nanocarreado apresentou a melhor atividade antimicrobiana dentre todos os tratamentos ($p < 0,05$) sobre todos os isolados de mastite bovina.

5.0 CONCLUSÃO

Todos os tratamentos com o carvacrol com nanocarreador apresentaram forte ação bactericida sob bactéria Gram positiva e Gram negativa. Os tratamentos com o valor de pH foram mais efetivos, possivelmente devido a uma ação sinérgica na inativação de *S. aureus* e *E. coli*.

Neste contexto, o uso de carvacrol com nanocarreador pode ser uma alternativa viável, além de ambientalmente sustentável, para ser utilizado como sanitizante químico em diferentes segmentos para alimentos na agroindústria.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A. et al. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178–1184, 2010.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 49(9), p.4168-70, 2001.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; LIMA, J. C. Adesão e formação de biofilmes microbianos. In: ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Varela, cap.4, p. 185 – 228, 2008.
- BARDIAU, M. et al. Genotypic and phenotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk of bovine mastitis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, p.181–186,2013.
- BANIPAL, T. S.; KAUR, A.; BANIPAL, P. K. Physicochemical aspects of the energetics of binding of sulphanic acid with bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 170, p. 214–225, 2017.
- BLUM, S. E.; LEITNER, G. Genotyping and virulence factors assessment of bovine mastitis *Escherichia coli*. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3–4, p. 305–312, 2013.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-53, 2004.
- CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. Structure of serum albumins. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153–203, 1994.
- CASSOL, D. M. et al. A. Introdução agentes da mastite diagnóstico e tratamento. **A Hora Veterinária**, v. 29, n.175, 2010.
- CERIZE, N. N. P. Estudos de sistemas nanocarreadores para o ácido 5 aminolevulínico com Aplicação na Terapia Fotodinâmica. **Tese de Doutorado** (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) – USP, Ribeirão Preto – SP, p. 48, 2012.
- CHEN, F. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 30–39, 2009.
- DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant

Staphylococcus aureus Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. 11-19, 2016.

DAVEY, HM, WINSON, MK.. Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. **Current Issues in Molecular Biology**, v.5, p.9-15, 2003.

DONSÌ, F. et al. Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 22, p. 212–220, 2014.

ERSKINE, R. J. et al. ADVANCES IN THE THERAPY FOR MASTITIS. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 9, n. 3, p. 499–517, 1993.

FALEIRO M.L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, n. 3, p. 1143–1156, 2011.

GUIMARÃES, F.F; LANGONI, H. Leite: alimento imprescindível, mas com riscos para a saúde pública. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p.38-51, 2009.

GUPTA, S.; VARIYAR, P. S. **15 - Nanoencapsulation of essential oils for sustained release: application as therapeutics and antimicrobials**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano - Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265–273, 2013.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. **VFP**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.

MÄDER, K.; MEHNERT, W. Solid Lipid Nanoparticles - Concepts, procedures and Physicochemical Aspects. In: NASTRUZZI, C. *Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods and Applications*. Boca Raton: CRC PRESS, 2005. p.1-22.

MONTANARI, R. M. et al. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v.17(8), p. 9728-40, 2012.

MOON, J. et al. Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant *Staphylococci* Isolated from Bovine Mastitis in Korea Phenotypic and Genetic Antibigram of Methicillin-Resistant. n. APRIL 2007, 2016.

PARISH, M.E. et al. Methods to reduce/eliminate pathogens form fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.2 (supplement), 2003.

PATIL, S. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. **Biomaterials**, v. 28, n. 31, p. 4600–4607, 2007.

ROMA, J. L.C. et al. Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p.1411-1418, 2009.

ROTA, C.; HERRERA, A.; MARTI, R. M. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food control**, v. 19, p. 681–687, 2008.

ROY, A. S. et al. A spectroscopic study of the interaction of the antioxidant naringin with bovine serum albumin. *Journal of Biophysical Chemistry*, v. 1, n. 3, p. 141–152, 2010.

ROYSTER, E.; WAGNER, S. Treatment of Mastitis in Cattle. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. 31, n. 1, p. 17–46, 2015

SHAHEEN, M.; TANTARY, H.; NABI, S. A Treatise on Bovine Mastitis: Disease and Disease Economics, Etiological Basis, Risk Factors, Impact on Human Health, Therapeutic Management, Prevention and Control Strategy. **Journal Advances in Dairy Research**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2016.

TRANCOSO, M. D. **Projeto óleos essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano**. Revista Práxis. V. n. 9. 2013.

TAYLOR, P. et al. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents Plant Essential Oils as Active. n. November 2013, p. 37–41, 2014.

TROTT, A. J. et al. Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v.31, p.455-461, 2010.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2011.

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65 (10), p.4606–4610, 1999.

VENTUROSOSO, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VIGUIER, C., ARORA, S., GILMARTIN, N., WELBECK K., O’KENNEDY, R. Mastitis Detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27 n .8, p. 486-493, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; OREFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

WANG, N. et al. Journal of Colloid and Interface Science Influence of metal oxide nanoparticles concentration on their zeta potential. **Journal of Colloid And Interface**

Science, v. 407, p. 22–28, 2013.

WEISS, J. et al. Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. chapter 24, **Global Issues in Food Science and Technology**, 2009.

YEGIN, Y. et al. Development and characterization of geraniol-loaded polymeric nanoparticles with antimicrobial activity against foodborne bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, v. 170, p. 64–71, 2015.

ZADOKS R.N. et al. Mastitis-causing *Streptococci* are important contributors to bacterial counts in raw bulk tank milk. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2644-2650, 2004.

ZAFALON, L.F. et al. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação, **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

ZHAO, D. et al. delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, p. 669–677, 2010.

ZHENG, L. et al. Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. **Food Control**, v. 32, n. 2, p. 665–672, 2013.